

REC'D 31 OCT 2003

WIPO PCT

CT/KR 03/02159

RO/KR 16.10.2003



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 : 10-2002-0063626
Application Number

출원년월일 : 2002년 10월 17일
Date of Application OCT 17, 2002

출원인 : 한국과학기술연구원
Applicant(s) KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



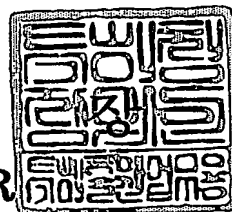
2003 년 10 월 16 일

특

허

청

COMMISSIONER



BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.10.17
【발명의 명칭】	N-타입 칼슘 채널의 활성을 억제함으로써 우울증을 감소시키는 방법
【발명의 영문명칭】	Method for decreasing depression by inhibiting the activity of N-type calcium channel
【출원인】	
【명칭】	한국과학기술연구원
【출원인코드】	3-1998-007751-8
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	1999-041511-2
【발명자】	
【성명의 국문표기】	신희섭
【성명의 영문표기】	SHIN, Hee-Sup
【주민등록번호】	500729-1231314
【우편번호】	100-754
【주소】	서울특별시 중구 신당3동 844 남산타운아파트 14동 1701호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김찬기
【성명의 영문표기】	KIM, Chanki
【주민등록번호】	660217-1162226
【우편번호】	136-150
【주소】	서울특별시 성북구 석관동 176-87
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국생명공학연구원 유전자은행
【수탁번호】	KCTC 10158BP

【수탁일자】 2002.01.08
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 3
【서열목록의 전자파일】 첨부
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의
한 출원심사 를 청구합니다. 대리인
이원희 (인)
【수수료】
【기본출원료】 20 면 29,000 원
【가산출원료】 11 면 11,000 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 11 항 461,000 원
【합계】 501,000 원
【감면사유】 정부출연연구기관
【감면후 수수료】 250,500 원
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 미생물기탁증명서[및 번역문]_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 우울증을 감소시키는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 N-타입 칼슘 채널의 활성을 억제함으로써 우울증을 감소시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, N-타입 칼슘 채널이 억제된 유전자 변이 생쥐는 정상생쥐보다 현저히 감소된 항우울증 반응을 나타내므로 N-타입 칼슘 채널의 활성을 억제하는 물질은 우울증 치료제로서 유용하게 사용될 수 있으며, 또한, N 타입 칼슘 채널을 이용하여 항우울제를 스크리닝할 수 있다.

【대표도】

도 3

【명세서】

【발명의 명칭】

N-타입 칼슘 채널의 활성을 억제함으로써 우울증을 감소시키는 방법{Method for decreasing depression by inhibiting the activity of N-type calcium channel}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 $\alpha 1B$ 유전자좌, 적중벡터 및 적중된 유전자좌를 나타낸 모식도이고,

A : 정상 $\alpha 1B$ 유전자 좌,

B : IS3 부분이 GFP-Neo로 치환되고, tk 유전자를 포함하는 적중벡터,

C : 적중벡터에 의해 적중된 유전자 좌,

□: 프로브로 사용될 절편,

도 2의 A는 본 발명의 유전자 변이 생쥐에 대한 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B^{-/-}$ 유전자형을 PCR로 확인한 결과이고,

레인 1 : 마커,

레인 2 : 정상 생쥐(+/+),

레인 3 : 이형접합체 생쥐(+/-),

레인 4 : 동형접합체 생쥐(-/-),

도 2의 B는 본 발명의 유전자 변이 생쥐에 대한 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B^{-/-}$ 유전자형을 서던 블롯 분석(southern blot analysis)으로 확인한 결과이고,

레인 1 및 2 : 정상 생쥐(+/+),

레인 3 내지 5 : 이형접합체 생쥐(+/-),

레인 6 및 7 : 동형접합체 생쥐(-/-),

도 2의 C는 본 발명의 유전자 변이 생쥐의 뇌조직에서 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ 단백질이 발현되지 않음을 웨스턴 블롯 분석(western blot analysis)으로 확인한 결과이고,

레인 1 : 정상 생쥐의 소뇌, 레인 2 : 유전자 변이 생쥐의 소뇌,

레인 3 : 정상 생쥐의 대뇌, 레인 4 : 유전자 변이 생쥐의 대뇌,

도 3은 N-타입 칼슘 채널의 활성이 억제된 $\alpha 1B$ 유전자 변이 생쥐와 정상 생쥐의 강제 수영 시험 결과를 보여주는 그래프이고,

도 4는 N-타입 칼슘 채널의 활성이 억제된 $\alpha 1B$ 유전자 변이 생쥐와 정상 생쥐의 꼬리 매달기 시험 결과를 보여주는 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<17> 본 발명은 우울증을 감소시키는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 N-타입 칼슘 채널에 특이적으로 작용하여 활성을 억제함으로써 우울증을 감소시키는 방법에 관한 것이다.

<18> 전압-의존적 칼슘 채널(voltage-dependent calcium channel)은 신경전달물질의 분비, 막 흥분성 및 유전자 발현을 조절함에 있어서 중요한 역할을 하며, 현재까지 여러 종류의 전압-의존적 칼슘 채널이 밝혀져 있다(Catterall,

Cell Calcium, 1998, 24, 307-323). 전압-의존적 칼슘 채널은 $\alpha 1$, $\alpha 2$, β 및 γ 의 소단위체로 구성되는 다중-소단위체 구조를 갖고 있으며(Dunlap *et al.*, *Trends Neurosci.*, 1995, 18, 89-98; De Waard *et al.*, *Ion Channels*, 1996, 4, 41-87; Hofmann *et al.*, ., 1999, 139, 33-87), 전기생리학적 또는 약학적 성질에 따라 L-타입, N-타입, P-타입, Q-타입, R-타입 및 T-타입으로 분류된다(Tsien *et al.*, 1987, 41, 167-187; Randall and Tsien, *J. Neurosci.*, 1995, 15, 2995-3012). 일반적으로, L-타입, N-타입, P/Q-타입, R-타입은 높은 전압에서 통로가 열리며, T-타입의 경우는 낮은 전압에서 통로가 열리는 특징을 가지고 있다. 전압-의존적 칼슘 채널의 소단위체중 $\alpha 1$ 소단위체는 칼슘 통로가 작용하는데 필수적인 역할을 하고 통로의 성질을 결정하며, 현재까지 $\alpha 1$ 소단위체의 여러 서브그룹을 암호화하는 6개의 서로 다른 유전자($\alpha 1A$ - $\alpha 1F$)가 밝혀져 있다(Chin., *Exp. Mol. Med.*, 1998, 30, 123-130; Ertel *et al.*, *Neuron*, 2000, 25, 533-535; Hofmann ., *Rev. Physiol. Pharmacol.*, 1999, 139, 33-87).

- <19> 인 시투 혼성화(in situ hybridization)를 통해 쥐의 뇌에 존재하는 $\alpha 1$ 소단위체의 존재유무를 살펴보면 $\alpha 1B$ 소단위체가 중추신경계의 전반에 걸쳐 발현되며, 특히 감정조절부위인 배측 솔기(dorsal raphe) 부위와 청반(locus coeruleus) 부위에도 존재하는 것으로 알려져 있다(TanaKa *et al.*, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1995, 30, 1-16). 세포내 수준에서 보면 $\alpha 1B$ 소단위체는 주로 신경세포의 프리시냅스(presynapse)의 말단에 위치하여 다양한 신경전달물질의 분비를 조절하는 생리학적 기능을 하며(Miller,

Science, 1987, 235, 46-52; Hirning *et al.*, *Science*, 1988, 239, 57-61; Westenbroek ., *J. Neurosci.*, 1995, 15, 6403-18), 그 외에도 프리시냅스 또는 포스트시냅스(postsynapse)에서 세로토닌 및 노르에피네프린 수용체의 억제성 조절기능에 관여하여 시냅스내 신경전달을 조절하는 것으로 알려져 있다(Okada, *et al.*, *J. Neurosci.*, 2001, 21, 628-640; Rittenhous A.R., *J. Neurobiol.*, 1999, 40, 137-148; Sun, Q.Q., *et al.*, , 1998, 510, 103-20).

<20> 최근 들어 유전자 적중방법으로 N-타입 칼슘 채널의 $\alpha 1B$ 소단위체를 결핍시킨 변이생쥐를 이용하여 생체내에서 침해수용(nociceptor) 정보의 처리에 관한 N-타입 칼슘 채널의 정확한 역할을 규명하는 몇 가지 유전적 연구결과가 보고되었다(Kim *et al.*, *Mol. Cellular Neuroscience*, 2001, 18, 235-245; Saegusa, H. *et al*, *EMBO J.*, 2001, 15, 2349-56; Hatakeyama, S. *et al*, *Neuroreport*, 2001, 8, 2423-7). 상기 문헌들에 따르면, $\alpha 1B$ 변이생쥐는 기계적 통증, 복사열에 의한 통증 및 염증성 통증에 대해 정상 생쥐보다 현저히 감소된 통증반응을 보였으며, 또한 신경손상으로 인해 야기된 무해자극에 대한 통증과 열에 대한 과민 통증에도 정상생쥐보다 현저한 감소를 보였다. 따라서, N-타입 칼슘 채널은 척수와 척수이상의 수준에서 통증을 인식하는데 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다. 그 외에도 고공 십자 미로 시험(elevated plus maze test)을 통하여 $\alpha 1B$ 변이생쥐가 정상생쥐보다 불안감이 감소되어 있다는 연구결과가 보고되었다(Saegusa, H. *et al*, *EMBO J.*, 2001, 15, 2349-56). 그러나, 우울증과 같은 감정장애에 대하여 N-타입 칼슘 채널의 정확한 역할을 규명하는 약리학적 또는 유전적 연구결과는 아직까지 보고되어 있지 않다.

- <21> 이에, 본 발명자들은 N-타입 칼슘 채널 $\alpha 1B$ 유전자를 적중시킨 변이 생쥐를 이용하여 대표적 감정장애인 우울증과 N-타입 칼슘 채널의 생리학적 기능과의 연관성을 규명하고자 다양한 우울증 관련 동물 행동실험을 수행하여, N-타입 칼슘 채널의 활성이 저해되면 우울증 증상이 감소됨을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <22> 본 발명의 목적은 N-타입 칼슘 채널의 활성을 억제함으로써 우울증을 감소시키는 방법을 제공하는 것이다.
- <23> 또한, 본 발명의 다른 목적은 N-타입 칼슘 채널을 이용하여 항우울제를 스크리닝하는 방법과 N-타입 칼슘 채널의 억제제를 유효성분으로 함유하는 항우울증제를 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <24> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 N-타입 칼슘 채널의 활성을 억제함으로써 우울증을 감소시키는 방법을 제공한다.
- <25> 또한, 본 발명은 N-타입 칼슘 채널의 $\alpha 1B$ 유전자 또는 그 단백질을 이용하여 항우울증제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- <26> 또한, 본 발명은 N-타입 칼슘 채널의 억제제를 유효성분으로 함유하는 항우울증제를 제공한다.
- <27> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<28> I. 본 발명은 N-타입 칼슘 채널의 활성을 억제함으로써 우울증을 감소시키는 방법을 제공한다.

<29> 상기에서, N-타입 칼슘 채널의 활성을 억제하는 방법으로는 N-타입 칼슘 채널에 특이적으로 작용하여 활성을 억제하는 물질을 투여하거나, 상기 N-타입 칼슘 채널에 특이적으로 결합하는 항체를 투여하거나, N-타입 칼슘 채널을 코딩하는 유전자의 전사를 억제하거나, 전사된 N-타입 칼슘 채널 유전자의 번역을 억제하는 방법 등이 있으나 반드시 여기에 한정되는 것은 아니며, 상기에서 열거한 방법 이외에도 N-타입 칼슘 채널의 활성을 억제하는 모든 방법이 사용될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 N-타입 칼슘 채널을 코딩하는 $\alpha 1B$ 유전자가 적중되어 N-타입 칼슘 채널이 발현되지 않는 생쥐를 사용하여 N-타입 칼슘 채널의 활성억제와 항우울증과의 상관관계를 조사하였다(도 3 및 도 4 참조).

<30> 본 발명자들은 N-타입 칼슘 채널이 대표적 감정장애인 우울증과 관련되어 있는지 여부를 확인하기 위하여, $\alpha 1B$ 유전자 변이 생쥐(대한민국 특허출원 제2002-2343호)를 이용하여 대표적인 우울증 관련 동물행동실험인 강제 수영 시험(forced swimming test) 및 꼬리 매달기 시험(tail suspension test)을 수행한 결과, 강제 수영 시험의 경우 물이 담긴 비이커 안에서 15분 동안 생쥐를 수영시켰을 때 정상생쥐는 초기 5분부터 우울증세인 부동부유행동(immobile floating position)을 보인 반면 $\alpha 1B$ 변이 생쥐는 15분 내내 계속해서 수영을 하는 행동을 보여 정상생쥐보다 물위에 부동부유하는 시간이 전반적으로 현저히 짧음을 확인함으로써 $\alpha 1B$ 변이 생쥐는 정상 생쥐보다 우울증이 현저히 감소된 반응을 보임을 확인하였다(도 3 참조). 또한, 꼬리 매달기 시험의 경우에도 강제 수영 시험의 경우와 유사하게 $\alpha 1B$ 변이생쥐는 정상생쥐보다 현저히 감소된 부동시간(immobilization time)을 나타내었다(도 4 참조). 상기에서 살

펴본 바와 같이, N-타입 칼슘 채널을 코딩하는 유전자가 적중된 $\alpha 1B$ 변이 생쥐는 두 가지 우울증 관련 행동실험에서 항우울증 반응을 보였다.

<31> 최근 들어 세로토닌(serotonin)과 노르에피네프린(norepinephrine)과 같은 모노아민(monoamine) 들이나 펩타이드인 물질 P (substance P)의 조절 이상이 우울증과 병리 생리학적으로 연관성이 있으며 이런 신경 전달 물질들은 조절하는 약제가 현재 우울증 치료제로 개발되고 있다(Okada, *et al.*, *J. Neurosci.*, 2001, 21, 628-640; Rittenhouse A.R., *J. Neurobiol.*, 1999, 40, 137-148; Sun, Q.Q., *et al.*, *J. Physiol.*, 1998, 510, 103-20). 상기한 N-타입 칼슘 채널 활성이 억제된 $\alpha 1B$ 변이 생쥐는 세로토닌 재흡수 억제제(selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI), 노르에피네프린 재흡수 억제제(tricyclics), 일차아민 산화효소 억제제(monoamine oxidase inhibitors), 물질 P (substance P) 또는 NK-1 수용체 억제제 등과 같은 항우울증 치료제를 처리했을 경우와 동일한 행동반응을 나타낸다. 세로토닌 1A 수용체 변이 생쥐의 경우는 정상 생쥐보다 불안감은 고조되어 있는 반면 우울증은 감소되어 있는 것으로 알려져 있으며, 노르에피네프린 트랜스포터 변이 생쥐의 경우도 정상생쥐보다 감소된 우울증 행동반응을 나타낸다(Ramoz, S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 14476-81; Xu, F. *et al.*, *Nature Neuroscience*, 2000, 3, 465-471).

<32> 또한, 척수 수준에서의 통증과 관련하여 N-타입 칼슘 채널에 의해 분비되는 것으로 알려진 물질 P (substance P)과 그의 수용체인 NK-1 수용체의 기능을 저해하면 우울증 또는 불안감 등이 감소된다는 약리학적, 유전학적 연구결과들이 보고되었다(Santarelli, L.

et al., *PNAS USA*, 2001, 98, 1912-17). 그러나, 현재까지 N-타입 칼슘 채널이 우울증과 관련되어 있다는 연구 결과는 보고되어 있지 않다. 따라서 본 발명자들이 최초로 유전자 변이생쥐 이용한 우울증 관련 동물 행동실험을 통하여 N-타입 칼슘 채널의 활성이 억제되면 우울증을 감소시킨다는 것을 밝혔다.

<33> 감정조절기능과 관련된 그밖의 다른 칼슘 채널의 연구결과를 살펴보면, L-타입 칼슘 채널 억제제인 니모디핀(nimodipine)이 양극성 정서장애(bipolar disease)중 초고속 순환 양극성 정신장애(ultra-rapid-cycling bipolar)와 단순 반복 우울증(brief recurrent depression)을 완화시키는 기능이 있으며, 칼슘 채널 $\alpha 2$ -델타 억제제인 가바펜틴(gabapentin) 및 리튬(lithium)도 이러한 정서장애를 치료하는 후보물질이 될 수 있다는 연구결과가 보고되었다(Post, R.M., *et al.*, *Bipolar Disord.*, 2000, 2, 305-15; Goodnick, P.J., *Biopolar Disord.*, 2000, 2, 165-73). 그러나, 우울증과 관련된 칼슘 채널의 생체내 기능에 대해서는 본 발명의 연구결과 이외에는 전혀 보고된 바가 없으며, 본 발명자들이 최초로 N-타입 칼슘 채널 활성 억제제가 우울증 감소와 관련이 있음을 밝혔다.

<34> 결론적으로, $\alpha 1B$ 단백질의 발현을 억제하여 N-타입 칼슘 채널의 활성을 저해하면 항우울증 반응을 나타내며, 따라서 N-타입 칼슘 채널 유전자의 활성을 억제하는 물질이나 상기 유전자의 산물인 N-타입 칼슘 채널의 활성을 억제하는 물질이 우울증 치료제로 사용될 수 있음을 알 수 있다.

<35> II. 본 발명은 N-타입 칼슘 채널의 $\alpha 1B$ 유전자 또는 그 단백질을 이용하여 항우울증제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

<36> α 1B의 활성을 억제하는 물질을 찾는다면 이 물질은 항우울제로 사용될 수 있을 것이다. 따라서, 단백질의 활성을 억제하는 물질을 스크리닝하는 공지의 방법에 따라 α 1B의 활성을 억제하는 물질을 스크리닝할 수 있다. α 1B의 활성을 억제하는 물질을 스크리닝하는 일반적인 방법은

<37> 1) α 1B 구조 유전자 및 리포터 유전자가 작동하도록 포함된 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 얻는 단계;

<38> 2) 상기 형질전환체와 스크리닝하는 검체를 같이 넣어 배양하는 단계; 및

<39> 3) 리포터 유전자의 발현량을 측정하는 단계로 구성된다.

<40> 상기에서 리포터 유전자로 사용할수 있는 유전자로는 LacZ, GFP, 루시페라제 (luciferase) 등이 사용될 수 있으나, 반드시 여기에 한정되지 않음은 당업자에게 있어서 명백하다.

<41> III. 본 발명은 N-타입 칼슘 채널의 억제제를 유효성분으로 함유하는 항우울증제를 제공한다.

<42> 상기에서, N-타입 칼슘 채널의 억제제는 N-타입 칼슘 채널에 특이적으로 작용하여 활성을 억제하는 화합물, 상기 N-타입 칼슘 채널에 특이적으로 결합하는 항체, N-타입 칼슘 채널을 코딩하는 유전자의 전사를 억제하는 물질, 전사된 N-타입 칼슘 채널 유전자의 번역을 억제하는 물질 등이 있으나 반드시 여기에 한정되는 것은 아니며, 상기에서 열거한 물질 이외에도 N-타입 칼슘 채널의 활성을 억제하는 모든 물질이 사용될 수 있다.

<43> 상기 N-타입 칼슘 채널의 억제제는 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 바람직한 약제학적 제제로는 정제, 경질 또는 연질 캡셀제, 액제, 현탁제 등과 같은 경구투여용 제제, 주사용 용액 또는 현탁액과 같은 비경구투여용 주사제 등이 있으며, 이들 약제학적 제제는 약제학적으로 허용 가능한 통상의 담체, 예를 들어 경구투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을, 주사제의 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제 등을 사용하여 조제할 수 있다. 또한, 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

<44> 또한, 상기 N-타입 칼슘 채널의 억제제는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 텍스트란과 같은 카보하이드레이트, 아스코르브 산(ascorbic acid) 또는 글루타치온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이팅 물질(chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.

<45> 본 발명의 약학적 조성물에서 N-타입 칼슘 채널의 억제제의 총 유효량은 거환(bolus) 형태 혹은 상대적으로 짧은 기간 동안 확산(diffusion) 등에 의해 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 또한 다중 투여량(multiple dose)이 장기간 투여되는 분할 치료

방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기 N-타입 칼슘 채널의 억제제의 농도는 약의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 나이 및 건강상태 등 다양한 요인들을 고려하여 환자의 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 이 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 아피시딘 유도체 및 약학적으로 허용 가능한 그의 염의 약학적 조성물로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다.

<46> 상기 N-타입 칼슘 채널의 억제제의 바람직한 유효용량은 주사제의 경우는 0.014~0.14 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 경구 투여제의 경우는 0.14 ~1.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이고 하루 1~6회 투여될 수 있다(Richard D.P. and Judith A.P. *Pain*, 2000, 85, 291-296).

<47> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<48> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<49> <제조예 1> $\alpha 1\text{B}$ 유전자 변이 생쥐의 제조

<50> <1-1> 칼슘 이온 통로 $\alpha 1\text{B}$ 유전자가 결실된 적중벡터의 제작

<51> 본 발명자들은 칼슘 이온 통로 $\alpha 1\text{B}$ 유전자가 결실된 유전자 변이 생쥐를 제조하기 위하여, 일반적으로 사용되는 유전자 적중법(gene targeting method)을 이용하였다. 우선, $\alpha 1\text{B}$ 유전자를 포함하는 생쥐 게놈 DNA를 얻기 위해 129/sv 생쥐 게놈 DNA 절편들을 무작위로 삽입시킨 박테리오파지 람다 FIX II(bacteriophage lamda FIX II, Stratagene) 라이브러리를 $\alpha 1\text{B}$ 랫트 cDNA(AUG ~ 720 bp, Dr. Jin

HM(NIH)으로부터 얻음)를 프로브로 사용하여 스크리닝하였다. 상기 스크리닝을 통하여 $\alpha 1B$ 유전자 IS(intervening segment) 1-3 코딩 지역을 포함하는 18.4 kb 게놈 DNA를 가진 박테리오파지 클론을 얻었으며, 다양한 제한효소를 이용하여 제한효소지도를 완성한 후, 적중백터를 만드는데 사용하였다. 기본백터는 pBluescript II KS(+/-)(Stratagene)를 기본백터로 사용하였으며, pEGFP-1(Clontech) 백터로부터 SV40-폴리A를 포함하는 GFP(green fluorescent protein) 유전자를 잘라내어 엑손(아미노산 158)을 포함하는 *Bam*HI-태그 IS2에 융합하였다. pLNT 백터(Sugitai Noda로부터 얻음)로부터 PGK-neo 유전자를 잘라내어 GFP 유전자의 하위에 연결하였다.

<52> 그 결과, IS3 부분을 포함하는 절편이 결실되고, 양성 선별을 위한 GFP-NEO 카세트로 치환시킨 적중백터를 제조하였다(도 1). 음성 선별을 위해서는 HSB-tk 유전자를 5'-상동 지역의 5' 말단에 연결하였다.

<53> <1-2> 배아간세포로의 형질 도입

<54> 상기 제조에 <1-1>로부터 제작된 적중백터를 형질 도입시키기 위한 세포주로 J1 배아 간세포주를 사용하였다. 배아 기간세포 배양과 배아 조작은 이전의 문헌과 동일한 방법으로 수행하였다(Kim *et al.*, *Nature*, 1997, 389:290-293). J1 배아간세포(미국, MIT 의 R. Jeanisch로부터 분양 받음)를 ES 배지[15% 소 태아 혈청(fetal bovine serum, Hyclone Co.), 1 %페니실린-스트렙토마이신(phenicillin -streptomycin, Gibco Co.), 1 %비-필수 아미노산(Gibco Co.), 0.1 mM 2-머캅토에탄올(mercaptoethanol), DMEM 배지(Gibco Co.)]에 접종하고 37°C에서 2 내지

3일 동안 배양하였다. 상기 배양으로부터 얻은 배세포군에 0.25% 트립신이 포함된 1 mM EDTA 용액을 가하여 단일세포들로 분리하였다.

<55> 상기에서 단일세포로 분리된 배아간세포에 제조예 <1-1>에서 제작한 적중백터를 도입 (transfection)하기 위하여 일렉트로포레이션(electroporation)을 수행하였다. 구체적으로, 분리된 단일의 배아간세포 2×10^7 개와 제조예 <1-1>의 적중백터 DNA 25 μ g를 첨가하여 혼합한 후 270 V/500 microF 조건하에서 일렉트로포레이션을 실시하였다. 적중 백터가 도입된 배아간 세포를 0.3 mg/ml G418 및 2 μ M의 간사이클로버(gancyclovior)가 포함된 ES 배지에서 5 내지 7일 동안 배양하여 배아간세포 내 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ 유전자가 적중백터에 의해 정확하게 적 중된 배아간세포 클론을 선별·유지하였다. 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ 유전자의 결실이 확인된 배아 간세포 클론을 다시 ES 배지에 분주하여 18 내지 22시간 동안 배양한 후 트립신을 처리하여 단 일세포로 분리하고 생존한 세포만을 골라 미세주입에 사용하였다.

<56> <1-3> 키메라(chimera) 생쥐의 제조

<57> 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ +/-의 유전자형을 갖는 키메라 생쥐를 제조하기 위하여, 수정된 포 배아 세포에 상기 제조예 <1-2>에서 선별된 배아간세포 클론을 미세주입하였다. 구체적으로, C57BL/6J 생쥐(Jackson Laboratory, USA) 암컷과 수컷을

교배시키고, 교미 후 3.5일(3.5 p.c.)된 암컷을 경추탈골법으로 희생시켰다. 희생된 암컷으로부터 자궁을 적출하여 자궁 말단부를 가위로 절제한 후 1 ml 주사기를 이용하여 20 mM HEPES, 10% 소 태아 혈청, 0.1 mM 2-머캅토에탄올 및 DMEM을 포함하는 주사 용액 1 ml을 관류시켰다. 해부 현미경하에서 미세 유리관을 사용하여 상기 자궁조직으로부터 포배아를 분리하였으며, 분리한 포배아를 35 mm 페트리디쉬 위에 미리 떨어뜨려 놓은 주사 용액 방울에 옮긴 후 후속하는 도입과정에 사용하였다. 이와 같이 분리한 포배아에 상기 제조에 <1-3>에서 선별된 배아간세포 클론을 도입하기 위하여, 미세주입기(Zeiss 사)를 이용하여 홀딩(holding) 피펫으로 포배아의 내부세포괴(inner cell mass) 방향을 음압으로 잡은 상태에서 10 내지 15개의 배아간세포 클론을 흡입한 주사 피펫을 포배아의 포배강내로 삽입한 후 양압을 주어 배아간세포 클론을 포배아의 포배강내로 주입하였다. 상기 클론이 주입된 포배아를 정관수술한 수컷과 교배시킨 후 2.5 p.c.된 가임신 대리모 생쥐의 자궁에 이식하여 배아간세포 클론(J1) 및 C57BL/6J 생쥐의 포배아로부터 형성된 이형세포 교잡종의 일종인 키메라 생쥐의 발생을 유도하였다. 이때, 자궁이식은 애버틴(avertine, 1 mg/kg 몸무게)으로 마취된 대리모의 복부를 1 cm 정도 절제하고; 자궁 상부를 핀셋으로 집어 2 cm 정도 체외로 잡아당기고; 주사 바늘로 자궁에 구멍을 내어 이 구멍을 통하여 상기의 포배아를 미세유리관으로 주입하고; 내부 복강막을 봉합사로 두 바늘 꿰맨 다음 결가죽을 내과용 클립으로 봉입하는 방법을 사용하였다. 이렇게 배아간세포가 주입된 포배아를 대리모 생쥐의 자궁으로 이식하여 약 19일 동안 배양함으로써 배아간세포 유래의 세포와 포배아 유래의 세포가 융합되어 게놈 내 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ +/-의 유전자형을 가지는 키메라 생쥐를 확보하였다.

<58> <1-4> 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ +/- 유전자형의 이형접합체 생쥐 제조

- <59> 상기 제조예 <1-3>으로부터 얻은 수컷 키메라 생쥐를 C57BL/6J 암컷 생쥐와 교배하여 자손을 얻었다. 이중 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ +/-의 유전자형을 갖는 이형접합체 생쥐를 선별하기 위하여, 다음과 같이 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하였다.
- <60> 구체적으로, 생쥐 자손들로부터 게놈 DNA를 추출하기 위하여 생쥐 꼬리부분을 1.5 cm 정도 크기로 잘라낸 후, 상기 조직을 용해 완충액(100 mM Tris (pH 8.0), 5 mM EDTA, 200 mM 염화나트륨 및 0.2% SDS) 0.4 ml에 넣고, 여기에 0.1 mg/ml 이 되도록 단백질 분해효소 K(proteinase K)를 넣은 후 55℃에서 5시간 동안 처리하였다. 상기 반응액에 8 M 칼륨아세테이트 75 μ l와 클로로포름 0.4 ml을 가하여 흔들어 준 후 4℃에서 10분 동안 방치하였다. 상기 반응액을 15,000 rpm에서 원심분리하였다. 상층액 0.4 ml을 에탄올 1 ml에 넣어 게놈 DNA를 침전시킨 후 다시 70% 에탄올로 세척하고 건조시킨 다음 증류수 50 μ l로 녹였다.
- <61> 상기와 같이 추출된 생쥐 게놈 DNA 1 μ l를 주형으로 사용하고 서열번호 1로 기재되는 프라이머 1, 서열번호 2로 기재되는 프라이머 2 및 서열번호 3으로 기재되는 프라이머 3을 각각 10 pmol로 사용하여 PCR을 수행하였다. 이때, 프라이머 1과 프라이머 2는 정상 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ 유전자의 190 bp 크기의 영역을 증폭하고, 프라이머 1 및 프라이머 3은 적중된 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ 유전자의 320 bp 크기의 영역을 증폭하도록 고안되었다. PCR의 조건으로는 94℃에서 30초, 58℃에서 30초, 72℃에서 30초 동안 반응시키는 것을 40회 반복하였다. 이로부터 얻은 PCR 산물은 1.5% 아가로스 겔에 전기영동한 후 에티디움 브로마이드(ethidium bromide, EtBr)로 염색하여 관찰하였다.
- <62> 그 결과, 190 bp 크기와 320 bp 크기의 두 개의 밴드를 나타내는 생쥐를 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ +/-의 유전자형을 갖는 이형접합체 생쥐로서 선별하였다(도 2의 A 라인 3 참조).

63> <1-5> 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ $-/-$ 유전자형의 동형접합체 유전자 변이 생쥐의 제조

64> 상기 제조예 <1-3>에서 선별된 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ $+/-$ 의 유전자형을 갖는 이형접합체 생쥐 암컷과 수컷을 교배하여 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ $-/-$ 유전자형을 갖는 동형접합체 유전자 변이 생쥐를 얻었다. 제조된 유전자 변이 생쥐가 게놈 내 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ $-/-$ 유전자형을 갖는지를 확인하기 위하여 서던 블롯 분석 및 PCR을 수행하였으며, 유전자 변이 생쥐에서 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ 단백질이 발현되지 않음을 확인하기 위하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

<65> 먼저 서던 블롯 분석(southern blot analysis)을 하기 위해 상기 제조예 <1-4>와 동일한 방법으로 유전자 변이 생쥐의 꼬리 조직으로부터 게놈 DNA를 분리한 후 제한효소 *EcoRI*으로 절단하였다. 상기 생쥐 DNA에 대해 제조예 <1-1>의 DNA로부터 얻은 박스부분(□) 절편(도 1의 C)을 프로브로 사용하여 하이브리드 반응을 수행하였다. 이 때 대조구로는 정상 생쥐로부터 추출한 게놈 DNA와 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ $+/-$ 의 유전자형을 갖는 이형접합체 유전자 변이 생쥐로부터 추출한 게놈 DNA를 사용하였다.

<66> 그 결과는 도 2의 B와 같다. 도면에서 레인 1 및 레인 2는 대조구인 정상 생쥐($+/+$), 레인 3 내지 레인 5는 이형접합체 생쥐($+/-$), 레인 6 및 레인 7은 동형접합체 생쥐($-/-$)의 게놈 DNA를 나타내며, 8.0 kb 밴드는 정상 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ 유전자에서 유래된 것이고, 14.5 kb 밴드는 적중된 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ 유전자에서 유래된 것이다. 도면에서 보듯이, 제조된 유전자 변이 생쥐는 14.5 kb 밴드만을 보였으며, 이로부터 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ $-/-$ 의 유전자형을 갖고 있음을 확인하였다.

- 67> 다음으로 PCR(polymerase chain reaction) 분석을 하기 위해, 본 발명자들은 상기 제조 예 <1-4>와 동일한 방법으로 유전자 변이 생쥐의 꼬리 조직으로부터 게놈 DNA를 분리한 후, 이 게놈 DNA 1 μ l를 주형으로 사용하고 제조예 <1-4>와 동일한 프라이머를 사용하여 PCR을 실시하였다.
- 68> 그 결과, 정상 생쥐(+/+)에서는 190 bp의 하나의 밴드만 관찰되었고, 이형접합체 생쥐 (+/-)에서는 190 bp와 320 bp 두 개의 밴드가 관찰되었다. 또한, 본 발명의 유전자 변이 생쥐에서는 320 bp 밴드 하나만 관찰되어 상기 유전자 변이 생쥐가 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ -/-의 유전자형을 갖고 있음을 확인하였다(도 2의 A).
- 69> 다음으로 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ -/- 유전자의 유전자형을 갖고 있는 본 발명의 유전자 변이 유전자 변이 생쥐에서 실제로 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ 유전자가 발현되지 않음을 확인하기 위하여 웨스턴 블롯 분석(western blot analysis)을 수행하였다. 구체적으로, 정상 생쥐와 동형접합체 유전자 변이 생쥐를 경추탈골법으로 희생시킨 후 두개골을 절개하여 대뇌(cerebrum)를 분리하였다. 분리된 대뇌 조직을 단백질 분해 억제제가 포함된 용해액(50 mM Tris (pH 7.4), 1 mM EGTA, 1 mM DTT 및 1 mM PMSF, 단백질 분해 억제 혼합액 (Boehringer Mannheim), 칼페인 억제제 I 과 II)에 넣어 분쇄하였다. 상기 조직액을 1,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 상층액과 침점물을 분리한 후 상층액만을 취하여 다시 28,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하여서 대략의 세포막 단백질을 얻었다. 상기 세포막 단백질을 8~16% 아크릴아미드 겔에 전기영동하고 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane, PROTRAN, Schleicher & Schuell 사)에 트랜스퍼 하였다. 상기 니트로셀룰로오스 막에 5% 탈지유가 포함된 TTBS 완충액(10 mM Tris 완충용액(pH 7.5), 150 mM 염화나트륨, 0.05% tween 20)을 처리하였다. 이어서

칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ 에 대한 단일항체 $\alpha 1B$ (CW21, Vance *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 14495-502)를 처리하여 하이브리드 반응을 수행하였다. 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ 단백질에 결합한 단일항체를 검출하기 위하여 퍼옥시다제 (peroxidase)가 결합된 항-생쥐 IgG 항체를 첨가한 후 ECL 키트 (Amersham 사)를 기질로 사용하여 발색반응을 시켰다.

<70> 그 결과는 도 2의 C와 같다. 도면에서 레인 1은 정상 생쥐, 레인 2는 유전자 변이 생쥐의 소뇌 단백질이고, 레인 3은 정상 생쥐, 레인 4는 유전자 변이 생쥐의 대뇌 단백질이다. 도면에서 보듯이 유전자 변이 생쥐에서 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ 단백질이 생성되지 않고 있음을 확인하였다. 본 발명자들은 상기 칼슘 이온 통로 $\alpha 1B$ +/- 유전자형을 갖는 유전자 변이 생쥐의 수정란을 2002년 1월 8일부로 한국생명공학연구원 유전자 은행에 기탁하였다(수탁번호; KCTC 10158BP).

<71> <실시예 1> N-타입 칼슘 채널이 우울증에 미치는 영향 측정

<72> N-타입 칼슘 채널이 제거된 $\alpha 1B$ 변이 생쥐(수탁번호 ; KCTC 10158BP)의 우울증 관련 행동실험에 대한 반응을 관찰하기 위하여, 본 발명자들은 상기 생쥐와 대조군 생쥐를 이용하여 강제 수영 시험과 꼬리 매달기 시험을 수행하였다. 모든 동물들은 온도, 습도가 조절되는 환경에서 음식과 물에 자유롭게 접근할 수 있게 하였으며, 12시간의 밤/낮 사이클로 아침 8시에 낮이 시작하는 조건 하에서 사육하였다. F1 생쥐의 암컷, 수컷 모두 실험에 사용하였으며, 8 내지 10주령의 생쥐를 사용하였다. 모든 행동 실험은 단일맹검법(blind test)에 따라 시행하였다. 모든 우울증관련 행동시험은 24시간 주기의 영향을 최소화하기 위하여 아침 9시에서 정오 사이에 수행하였으며, 모든 생쥐는 각 실험에 한번씩만 사용하였다.

<73> <1-1> 강제 수영 시험에 대한 부동성반응의 감소

<74> 강제 수영 시험은 포르솔트 등의 문헌을 참고하여 일부 변형된 방법으로 수행하였다 (Posolt, R.D. *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, 1978, 47, 379-391). 구체적으로, 본 발명자들은 물이 담긴 4 ℓ의 플라스틱 비이커 (13 cm × 25 cm) 안에 15 cm 깊이의 물을 채우고 α1B 변이 생쥐와 대조군 생쥐에게 수영을 강제로 하도록 하여 피할 수 없는 스트레스에 의한 우울증을 유발시켰으며, 우울증 행동반응으로 표현되는 부동부유한 시간을 측정하였다. 총 15분 동안 측정하였으며, 5분 간격으로 데이터를 집계하여 평균값을 분석에 사용하였다.

<75> 그 결과, 강제 수영 시험에서 생쥐는 15분 동안 물이 담긴 비이커 안에서 수영을 시켰을 때, 정상생쥐는 초기 5분부터 우울증세인 부동부유행동(immobile floating position)을 보인 반면, α1B 변이생쥐는 15분 내내 계속해서 수영을 하는 행동을 보여 정상생쥐보다 물위에 부동부유하는 시간이 전반적으로 현저히 짧았다. 상기 사실로부터, α1B 변이생쥐는 정상생쥐보다 우울증이 감소된 반응을 보임을 확인하였다(도 3 참조).

<76> <1-2> 꼬리 매달기 시험

<77> 꼬리 매달기 시험은 스테루 등의 문헌을 참고하여 수행하였다(Steru, L. *et al.*, *Psychopharmacology*, 1985, 85, 367-370). 구체적으로, 동물을 각각 35 cm × 40 cm 되는 통속에 바닥으로부터 생쥐머리가 25 cm 높이에 위치하도록 꼬리를 테이프로 감은 후 금속막대 중앙에서 7분 동안 매달기를 실시하였으며, 비디오로 촬영하여 단일맹검법으로 부동시간을 측정하

였다. 초기 1분 동안은 격렬한 행동을 보이는 시기로 초기 1분을 제외한 6분 동안 우울증 행동반응으로 표현되는 부동시간을 집계하여 평균값을 분석에 사용하였다.

<78> 그 결과, 꼬리 매달기 시험의 경우에도 강제 수영 시험의 경우와 유사하게 $\alpha 1B$ 변이생쥐는 정상생쥐보다 현저히 감소된 부동시간(immobilization time)을 나타내었다(도 4 참조). 상기의 결과로부터, $\alpha 1B$ 유전자 변이 생쥐는 정상 생쥐에 비하여 현저히 감소된 부동화반응을 나타냄으로써 우울증이 현저하게 감소되어 있음을 확인하였다.

【발명의 효과】

<79> 상기에서 살펴본 바와 같이, N-타입 칼슘 채널이 억제된 유전자 변이 생쥐는 정상생쥐보다 현저히 감소된 항우울증 반응을 보이므로 상기 N-타입 칼슘 채널 유전자의 활성을 억제하면 우울증 반응을 감소시킬 수 있으며, 따라서 상기 N-타입 칼슘 채널 유전자의 활성을 억제하는 물질이나 상기 유전자의 산물인 N-타입 칼슘 채널의 기능을 억제하는 물질은 우울증의 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

N-타입 칼슘 채널의 활성을 억제함으로써 우울증을 감소시키는 방법.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, N-타입 칼슘 채널의 $\alpha 1B$ 의 활성을 억제함으로써 우울증을 감소시키는 방법.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, N-타입 칼슘 채널의 활성 억제는 N-타입 칼슘 채널에 특이적으로 작용하여 활성을 억제하는 물질을 투여함으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 4】

제 1항에 있어서, N-타입 칼슘 채널의 활성 억제는 N-타입 칼슘 채널에 특이적으로 결합하는 항체를 투여함으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 5】

제 1항에 있어서, N-타입 칼슘 채널의 활성 억제는 N-타입 칼슘 채널을 코딩하는 유전자의 전사를 억제함으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 6】

제 1항에 있어서, N-타입 칼슘 채널의 활성 억제는 전사된 N-타입 칼슘 채널 유전자의 번역을 억제함으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 7】

N-타입 칼슘 채널의 억제제를 유효성분으로 함유하는 항우울증제.

【청구항 8】

제 7항에 있어서, N-타입 칼슘 채널의 $\alpha 1B$ 의 억제제를 유효성분으로 함유하는 항우울제

【청구항 9】

제 7항에 있어서, N-타입 칼슘 채널의 억제제는 N-타입 칼슘 채널에 특이적으로 작용하여 활성을 억제하는 화합물, 상기 N-타입 칼슘 채널에 특이적으로 결합하는 항체, N-타입 칼슘 채널을 코딩하는 유전자의 전사를 억제하는 물질 및 전사된 N-타입 칼슘 채널 유전자의 번역을 억제하는 물질로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항우울증제.

【청구항 10】

$\alpha 1B$ 유전자 또는 그의 단백질을 이용하여 항우울제를 스크리닝하는 방법.

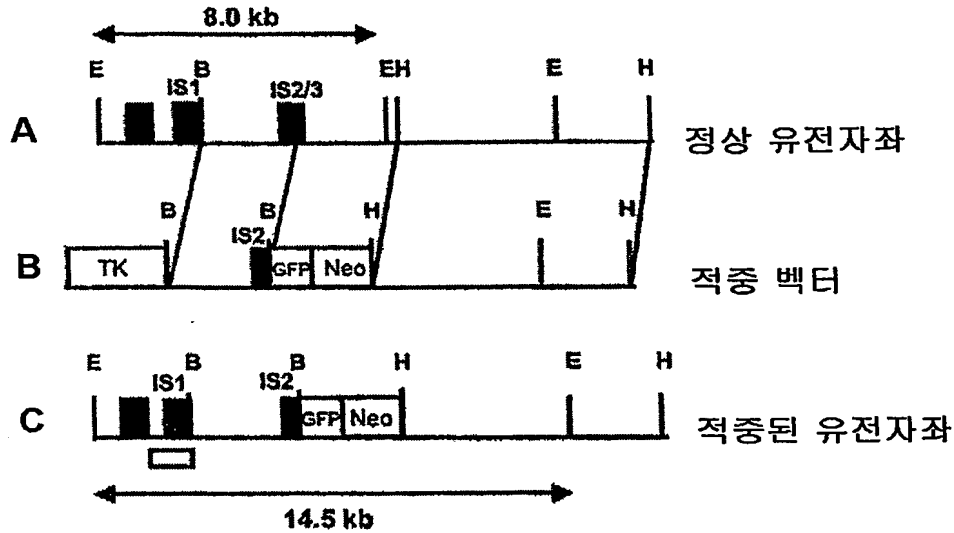
【청구항 11】

제 11항에 있어서,

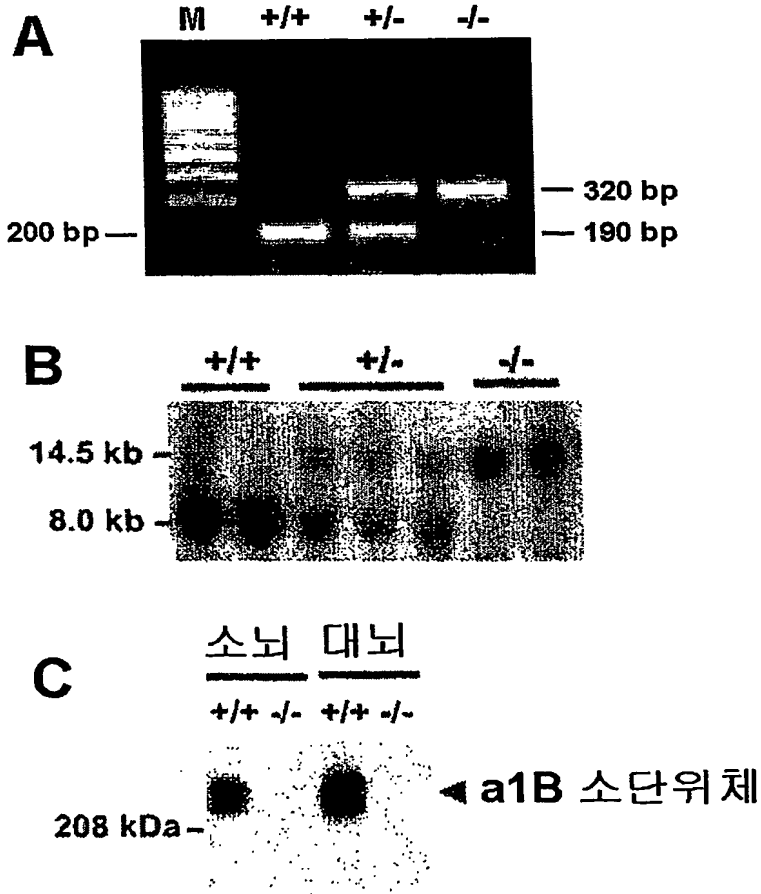
- 1) α 1B 구조 유전자 및 리포터 유전자가 작동하도록 포함된 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 얻는 단계;
- 2) 상기 형질전환체와 스크리닝하는 검체를 같이 넣어 배양하는 단계; 및
- 3) 리포터 유전자의 발현량을 측정하는 단계로 구성되는 것을 특징으로 하는 항우울제의 스크리닝 방법.

【도면】

【도 1】

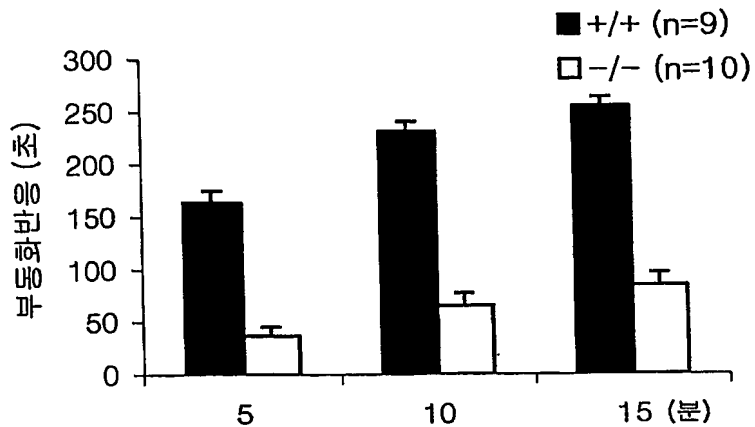


【도 2】



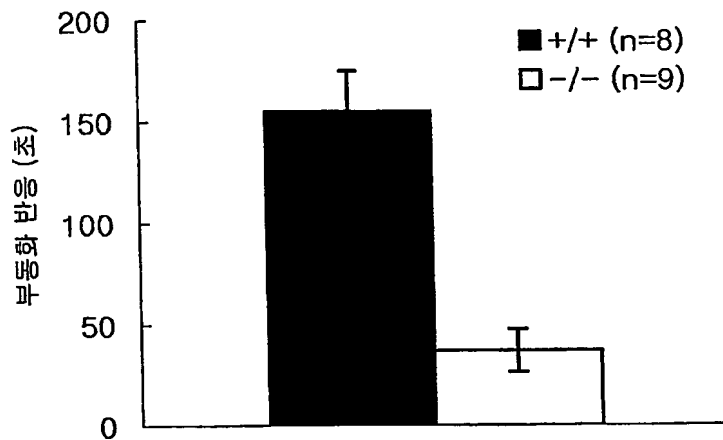
【도 3】

강제 수영 시험



【도 4】

꼬리 매달기 시험



【서열목록】

<110> KIST <120> Method for decreasing depression by inhibiting the activity of
 N-type calcium channel <130> 2p-08-48B <160> 3 <170>
 KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence
 <220> <223> primer 1 <400> 1 cagtcaggag ctgtcaagcc ac
 22 <210> 2 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer 2 <400> 2 ccacgaagtc catgacattc c

102 3626

출력 일자: 2003/10/23

21 <210> 3 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer 3 <400> 3 cgggcagctt gccggtggtg c

21

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.